Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit
EURATOM, München
(Leiter: Priv. Doz. Dr. Thierfelder)

Dextrose - bzw. Vitaminzusätze zum Nährmedium von Knochenmarkkulturen, untersucht mit der PAPPENHEIM - und PAS-Färbung.

Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Manfred Herting
aus Lippstadt

1973

Referent: Prof. Dr. I. Boll

Korreferent: Prof. Dr. B. Kempfle

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 6. Juli 1973

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung und Fragestellung
2. Methode
3. Ergebnisse
4. Beurteilung der Ergebnisse und Diskussion
5. Zusammenfassung
6. Legende
7. Literaturverzeichnis
8. Lebenslauf

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Einleitung und Fragestellung:

Die D-Glucose- auch Traubenzucker oder Dextrose genannt- ist in Form ihrer Polysaccharide der häufigste Zucker, der in der belebten Natur vorkommt. Außerdem steht sie im Mittelpunkt des Kohlenhydratstoffwechsels, da ihr Abbau gewöhnlich einen wesentlichen Teil der nutzbaren Energie liefert. Auch die Zellen in der Gewebekultur decken ihren Energiebedarf hauptsächlich aus dem Abbau der Glucose. Dies wurde zuletzt untersucht an einer permanent wachsenden Gewebekulturzellinie in Laktalbumin-Hefe- Medium (AVERDUNCK, 2). Die Versuchsreihen wurden an Fl-Zellen vorgenommen und die Kulturen als Schicht- und Suspensionskulturen gezüchtet. Dabei ergab sich die höchste Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit und die höchste Steigerung der Zellkonzentration bei Zusatz von Arginin, Glucose und Bikarbonat. Ein Zusatz von Glucose allein erbrachte nur eine geringe Steigerung des Wachstums.

Glucosezusatz an Knochenmarkkulturen ist wenig untersucht. ASTALDI und MEARDI (1) beschreiben einen Abfall des Glucosegehaltes der Leukocyten in normalen Knochenmarkkulturen bis auf null nach 72 Stunden, während bei Zusatz von 1% Glucose der Glucosegehalt der Zellen nicht so stark wie bei 1‰ Glucosezusatz abfällt. Nach 72 Stunden kann noch ein gewisser Glucosegehalt der Leukocyten bei 1% Glucosezusatz festgestellt werden. BOLL (5) und BRUNS (6) berichten über eine Vermehrung der sonst zeitabhängig reduzierten PAS-positiven Substanzen unter Glucosezusatz und schließen auf einen erhöhten Gehalt an Glucose in den segmentkernigen Granulocyten und ihren Vorstufen.

Der Vitaminzusatz- im folgenden als Nährlösung bezeichnet - ist eine von BOLL und WEISSENFELS hergestellte Mischung verschiedener Substanzen. Dies sind im einzelnen:

1. Ascorbinsäure	3,3 mg%
2. Folsäure	1,5 mg%
3. Adenosintriphosphat (ATP)	100,0 mg%
4. Thiaminpyrophosphat (TPP)	0,1 mg%
5. Glucose in variabler Konzentration	

Die Nährlösung wurde hergestellt, nachdem die proliferationsfördernden Wirkungen der einzelnen Substanzen an Knochenmarkkulturen festgestellt waren. Sie ergaben:

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0004

ad 1:

Die Versuchsreihen von SCHMIDT (18) zeigen eine Reifungsförderung der Granulopoese und normalen Erythropoese ohne Erhöhung der Regeneration nach Zusatz von 1 mg% Ascorbinsäure. Wir setzen unserer Nährlösung 3, 3 mg% Vitamin -C zu, die maximal in vivo erreichbare Dosis.

ad 2:

WILLIGERODT, P. (19) konnte zeigen, daß Folsäure eine leichte Proliferationssteigerung d. h. eine Förderung der Reifung und Regeneration der Erythropoese bewirkt. Während mit Konzentrationen von 0, 15 mg% und 1, 5 mg% die Regenerationssteigerung eindeutig zu erkennen war, werden die anderen Parameter der Proliferationskinetik diskutiert, da die Kulturen mit höherem Folsäurezusatz variierende Reifungstendenzen zeigen.

ad 3:

Die Untersuchungen von KAISER (14) ergeben eine signifikante Entkernungsvermehrung der Erythropoese bei Zusatz von 100 mg% ATP, einer Konzentration die unserer Nährlösung entspricht. Granulopoese und Regeneration bleiben unbeeinflußt.

ad 4:

STEINBRÜCK (17) untersucht die Wirkung von TPP auf patholqgische Knochenmarkkulturen. Bei einer sideroachrestischen Anämie und einem Morbus Hodgkin wird die Proliferation der Granulopoese stimuliert. Bei Carcinom-Patienten wird kein Einfluß auf die Knochenmarkkulturen gefunden.

Da über die Wirkung von Glucose auf Knochenmarkkulturen keine eindeutigen Angaben vorliegen, aber mögliche Beeinflußungen aus der Arbeit BRUNS (6) abgelesen werden können, soll der Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf das Knochenmark in vitro untersucht werden.

Außerdem wollen wir prüfen, ob nach den erfolgversprechenden Einzeluntersuchungen, die Kombination der Nährstoffe einen Einfluß auf das Knochenmark hat.

Dazu benutzen wir nach Möglichkeit normales Knochenmark. Wir verfolgen die Proliferation der Erythropoese und Granulopoese getrennt in 3 Fällen bis 72 Stunden Inkubation, einmal bis 120 Stunden. Zur Differentialzählung wird die PAPPENHEIM-Färbung benutzt, zur Kenntlichmachung des Glucosegehaltes der Zelle wird die PAS-Färbung herangezogen.

Methode:

Das Knochenmark für unsere Versuchsreihen wird dem Sternum der Patienten entnommen, ein kleiner Teil sofort ausgestrichen und der größere Teil kultiviert.

Zur Kultivierung benutzen wir die CARREL'sche Technik modifiziert nach BOLL (4). In vitro lassen sich durch diese Methode die Knochenmarkzellen einige Tage ohne großen Aufwand in ihrer ursprünglichen Form am Leben erhalten.

Als Nährboden werden 1 Tropfen Corhormon^{R} mit 4 Tropfen HANK'scher Lösung und 5 Tropfen Eigenplasma vermischt. Auf das Koagulum wird ein Knochenmarkbröckchen gesetzt, mit einem Tröpfchen Serum überschichtet, einem Hohlschliffobjektträger abgedeckt und unter sterilen Kautelen mit Paraffin luftdicht verschlossen. Darauf werden die Kulturen als hängende Tropfen im Brutschrank bei 37 ^{o}C bebrütet.

Für unsere Untersuchungen haben wir das Knochenmark von 4 Patienten -im folgenden mit Fall 1-4 bezeichnet- herangezogen. Die Kulturen wurden mit verschiedenen Zusätzen angelegt.

Fall 1:
1. Kontrollkultur ohne Zusatz (K)
2. Kultur mit einem Glucosezusatz von 120 mg% (Z1)
3. Kultur mit einem Glucosezusatz von 400 mg% (Z2)

Fall 2:
1. Kontrollkultur ohne Zusatz (K)
2. Kultur mit der oben beschriebenen Nährlösung, eingestellt auf 400 mg% Glucose (N1)
3. Kultur mit 400 mg% Glucose (Z)

Fall 3 und 4:
1. Kontrollkultur ohne Zusatz (K)
2. Kultur mit der Nährlösung, eingestellt auf 800 mg% Glucose (N2)
3. Kultur mit 800 mg% Glucose (Z)

Plasma und Serum enthalten nüchtern ca. 100 mg% Glucose und HANK'sche Lösung auch 100 mg%. Das Medium besteht aus 50% Plasma und 40% HANK'scher Lösung und enthält somit in den Kontrollkulturen eine Glucosekonzentration von ca. 90 mg% (5/10 x 100 und 4/10 x 100 = 90 mg%).
Die Kulturen mit Zusatz enthalten an Stelle von 4 Tropfen HANK'scher Lösung nur 3 Tropfen und dafür einen Tropfen Glucose- bzw. Nährlösung in verschiedenen Konzentrationen. Die wahren Endkonzentrationen in den Kulturen sind also für:

Fall 1:	
1. Kontrolle	90 mg% Glucose
2. Kultur mit Glucose (21)	200 mg% Glucose
3. Kultur mit Glucose (22)	480 mg% Glucose
Fall 2:	
1. Kontrolle	90 mg% Glucose
2. Nährlösung	480 mg% Glucose
3. Glucose	480 mg% Glucose
Fall 3 und 4:	
1. Kontrolle	90 mg% Glucose
2. Nährlösung	880 mg% Glucose
3. Glucose	880 mg% Glucose

Fall 1 - 3 werden bis 72 Stunden und Fall 4 bis 120 Stunden gezüchtet. Nach 24, 48, 72 Stunden bzw. 24, 48, 96, 120 Stunden werden je 4 Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet und je 2 Ausstriche mit MAY - GRÜNWALD und GIEMSA - Lösung nach PAPPENHEIM gefärbt. Aus jedem Präparat werden 1000 Zellen einschließlich der Mitosephasen gezählt und gleichzeitig nach den von BOLL (4) beschriebenen morphologischen Zellklassen differenziert. Bei einigen Präparaten müssen wir uns auf weniger Zellen beschränken, da ihre sichere Differenzierung nicht möglich ist. Aber zumindest sind es 750 Zellen. Insgesamt wurden nach der PAPPENHEIM-Färbung 77.714 Zellen differenziert.

Das Ergebnis bezieht sich in allen Fällen auf die Erythropoese, Granulopoese, Retikulumzellen, Plasmazellen, Megacaryocyten, Lymphocyten und Monocyten.

Ausgewertet werden dabei nur die roten und weißen Reihen, während die anderen Zellen nicht berücksichtigt werden.

Die rote Reihe wird unterschieden in:

Proerythroblasten	PB
basophile Erythroblasten	bE
polychromatische Erythroblasten	pE
oxyphile Erythroblasten	oE
reife Erythroblasten	rE

Dabei werden alle Stufen außer den reifen Erythroblasten als teilungsfähige Zellen angesehen.

Die weiße Reihe differenzieren wir in:

Myeloblasten	MB
Promyelocyten	PM
neutrophile, eosinophile, basophile Myelocyten	MY
Metamyelocyten	MM
stabkernige Granulocyten	STAB
neutrophile, eosinophile, basophile segmentkernige Granulocyten	SEG

Außer den stabkernigen und segmentkernigen Granulocyten werden alle zu den teilungsfähigen Zellen gerechnet. In der Auswertung werden eosinophile und basophile Zellen zu den dazugehörigen neutrophilen Zellklassen gerechnet, da ihre Zahl zu klein war.

Neben der Differenzierung der einzelnen Zellklassen werden die Mitosephasen nach BOLL (4) in 6 verschiedene Klassen eingeteilt ausgewertet.

Die Mitosen unterteilen sich in:

1. Prophase	P
2. frühe Metaphase	fM
3. späte Metaphase	sM
4. Anaphase	A
5. Telophase	T
6. Rekonstruktionsphase	R

Aus den Zählungen werden Reifungskurven und Tabellen der Mitoseindices gesondert für Erythropoese und Granulopoese dargestellt, sowie das Verhältnis der Reihen zueinander, der G/E-Index, aufgestellt.

Die übrigen Präparate der Kulturen werden nach einer modifizierten HOTCHKISS-MC MANUS PAS-Reaktion angefärbt. Nach RAUEN (16) werden dabei folgende Substanzen sichtbar gemacht:

1. Polysaccharide
2. neutrale Mucopolysaccaride
3. Muco- und Glycoproteide
4. Glycolipide
5. ungesättigte Fettsäuren in Neutralfetten und Phospholipiden

Nach einigen Färbeversuchen haben wir die Methode benutzt, die für den Routinebetrieb in unserem Labor gebräuchlich ist. Als Gegenfärbung wird anstelle von Hämalaun mit LÖFFLER's Methylenblau gegengefärbt, um eine bessere Differenzierung des Zellkerns zu erlangen. Die einzelnen Arbeitsgänge sind:

1. Lufttrocknen	1 Tag
2. Fixieren mit Methanol	10 Minuten
3. Abspülen mit aqua dest.	
4. Perjodsäure	8 Minuten
5. Schiff'sches Reagenz	20 Minuten
6. Abspülen mit aqua dest.	
7. LÖFFLER's Methylenblau	20 Sekunden

Zur Färbung sei noch hinzugefügt, daß alle Präparate gleichzeitig mit frisch zubereiteten Reagenzien gefärbt werden um die Unterschiede auszuschließen, die durch das relativ unstabile Schiff'sche Reagenz entstehen können.

In jedem Präparat versuchen wir zumindest 500 Zellen auszuzählen. Bei einigen war es nicht möglich, da besonders die Präparate mit Zusatz manchmal ziemlich zerstört sind. Aber es gelingt immer mindestens 350 Zellen pro Präparat zu erschließen.

Insgesamt werden mit der PAS-Färbung 36.934 Zellen erfaßt. Es werden also 114.648 Zellen mit beiden Färbungen zusammen ausgewertet. Leider ist bei Fall 1 die Kultur mit 400 mg% Glucosezusatz nicht in die PAS-Färbung mit einbezogen. Zur Differenzierung werden die vorher beschriebenen morphologischen Zellklassen benutzt. Des weiteren werden die PAS-positiven Zellen weiter differenziert in ihrem unterschiedlichen Anfärbbarkeitsgrad. Die Unterteilung beruft sich auf KAHN (13) modifiziert nach BOLL (4) und BRUNS (6):

PAS-negativ	= 0
PAS-schwachrosa	= 100
PAS-granularrosa	= 200
PAS-dunkelrot	= 300

Wir bezeichnen die Stärke der Anfärbbarkeit als PAS-Index, der sich als arithmetisches Mittel für jede Zellklasse errechnen läßt.

Gezählt werden die Zellen der Erythropoese, Granulopoese, Plasmazellen, Lymphocyten, Monocyten und Megakaryocyten. Eine Differenzierung der Zellen der Erythropoese unterbleibt, da alle Zellen PAS-negativ sind. Außerdem wird nur die weiße Reihe ausgewertet, deren Ergebnis graphisch dargestellt ist.

Ergebnisse:

Fall 1: Sch., Charlotte 74 Jahre

Die stationäre Aufnahme der Patientin erfolgte wegen Pleuraergüsse bei Zustand nach Ablatio mammae im Juli 1971 und nachfolgender Bestrahlung.
Am 12.1.1972 wurde sternalpunktiert. Der Knochenmarkbefund ergab keinen Anhalt für eine Knochenmarkcarcinose; abgesehen von einer Plasmazellvermehrung lagen alle Zell zahlen im Bereich der Norm.

Blutbild vom 28.12.71

Ery :	4,35 Mill/mm^3	Leukoc:	4300/mm^3
HB:	12,8 g%	Bas:	1 %
HbE:	29,6 pg	Eos:	2 %
		Stab:	5 %
		Seg:	68 %
		Lymphoc:	12 %
		Monoc:	12 %

Diagnose:
Metastasierendes Mammacarcinom bei Zustand nach Ablatio mammae 1971.

Es werden Kontrollkulturen (K), Kulturen mit einem Glucosezusatz von 120 mg% (Z1) und mit einem Glucosezusatz von 400 mg% (Z2) angelegt. Von den ausgezählten Zellen werden die Erythropoese und Granulopoese auf zweifache Weise ausgewertet:

1. mit Hilfe der Färbung nach PAPPENHEIM
2. mit Hilfe der PAS-Färbung.

Ergebnis der PAPPENHEIM-Färbung:
Die Ergebnisse sind in Abb. 1 und Tab. 1 und 2 dargestellt.
Bei den Reifungskurven (Abb. 1) werden außerdem die Mitoseindices und der G/E-Index zahlenmäßig angegeben.

Bei Beurteilung der Erythropoese ergibt sich, daß Z1 gegenüber der Kontrolle weniger stark ausreift. Der hohe Glucosezusatz (Z2) ergibt ein uneinheitliches Bild.

Zu Ungunsten der reifen Erythroblasten nehmen die anderen Zellen in der 24- und 48- Stunden-Kultur gegenüber der Kontrolle zu. In der 72-Stunden-Kultur ergibt sich eine Linksverschiebung für den hohen Glucosezusatz gegenüber den anderen Kulturen.

Die Mitoseindices der Erythropoese (rMi) verlaufen bis 24 Stunden analog für alle Kulturen, aber der Index für den hohen Glucosezusatz (Z2) bleibt auch bei längerer Bebrütung gegenüber den anderen Kulturen erhöht.

Bei der Granulopoese fällt auf, daß Z1 fast parallel den Kontrollwerten verläuft bis auf eine Linksverschiebung der 24-Stunden-Kultur. Dagegen zeigt der Glucosezusatz von 400 mg% zu jeder Zeit eine Reifungsbeschleunigung.

Der Mitoseindex der Granulopoese (wMi) bleibt für den hohen Glucosezusatz deutlich erhöht gegenüber den anderen Kulturen zu allen Zeiten.

Der G/E-Index bleibt im wesentlichen unverändert.

Die PAS-Färbung liegt nur für die Kontrollkulturen und für den Glucosezusatz von 120 mg% vor. Die weißen Reihen unterscheiden sich in ihrer PAS-Positivität untereinander im Sinne eines stärkeren PAS-Anfärbbarkeitsgrades für den Glucosezusatz gegenüber den Kontrollwerten. Abb. 2 und Tab. 3 geben Aufschluß über die geringen Unterschiede.

ABBILDUNG 1

FALL 1

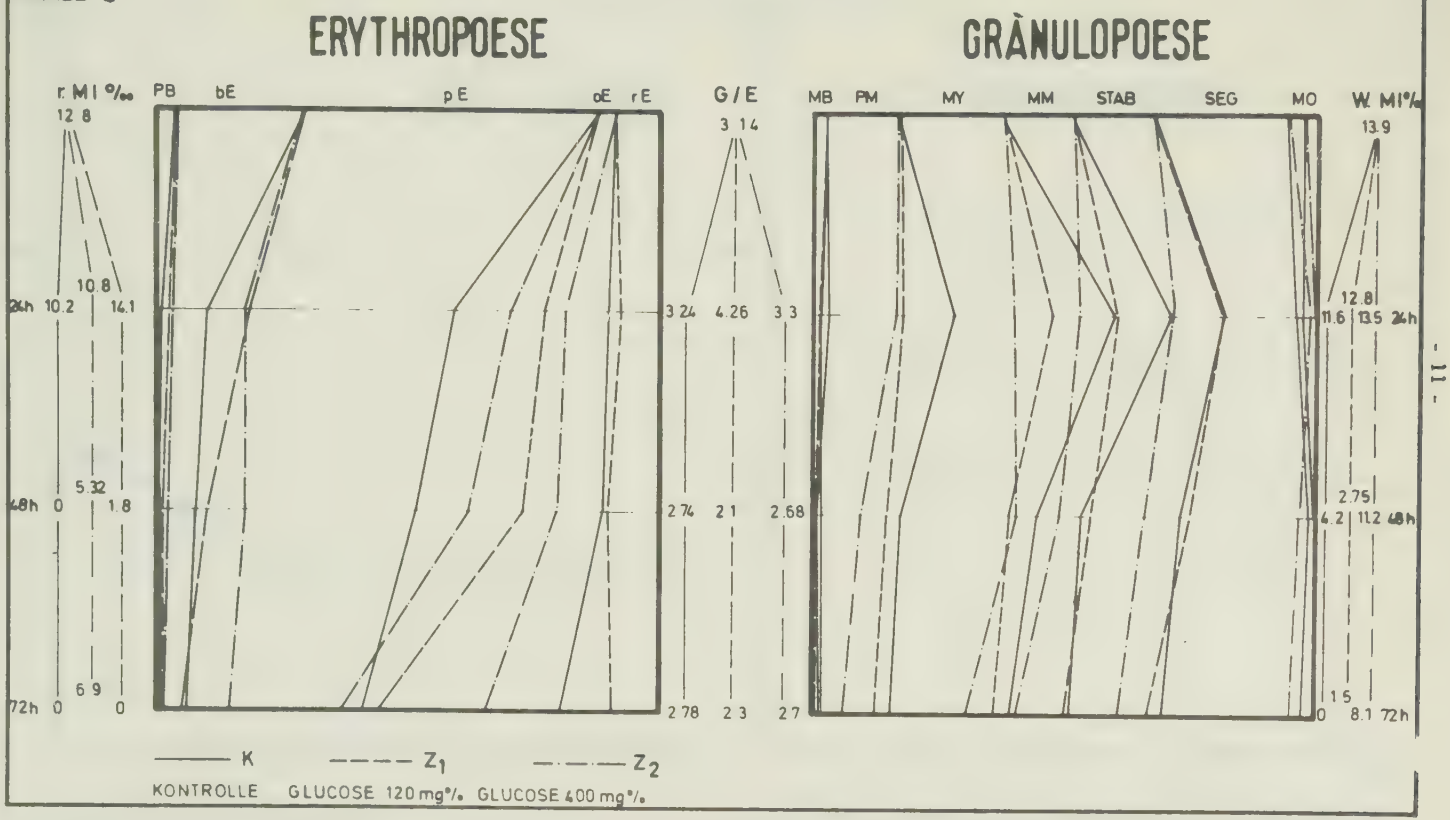


ABBILDUNG 2

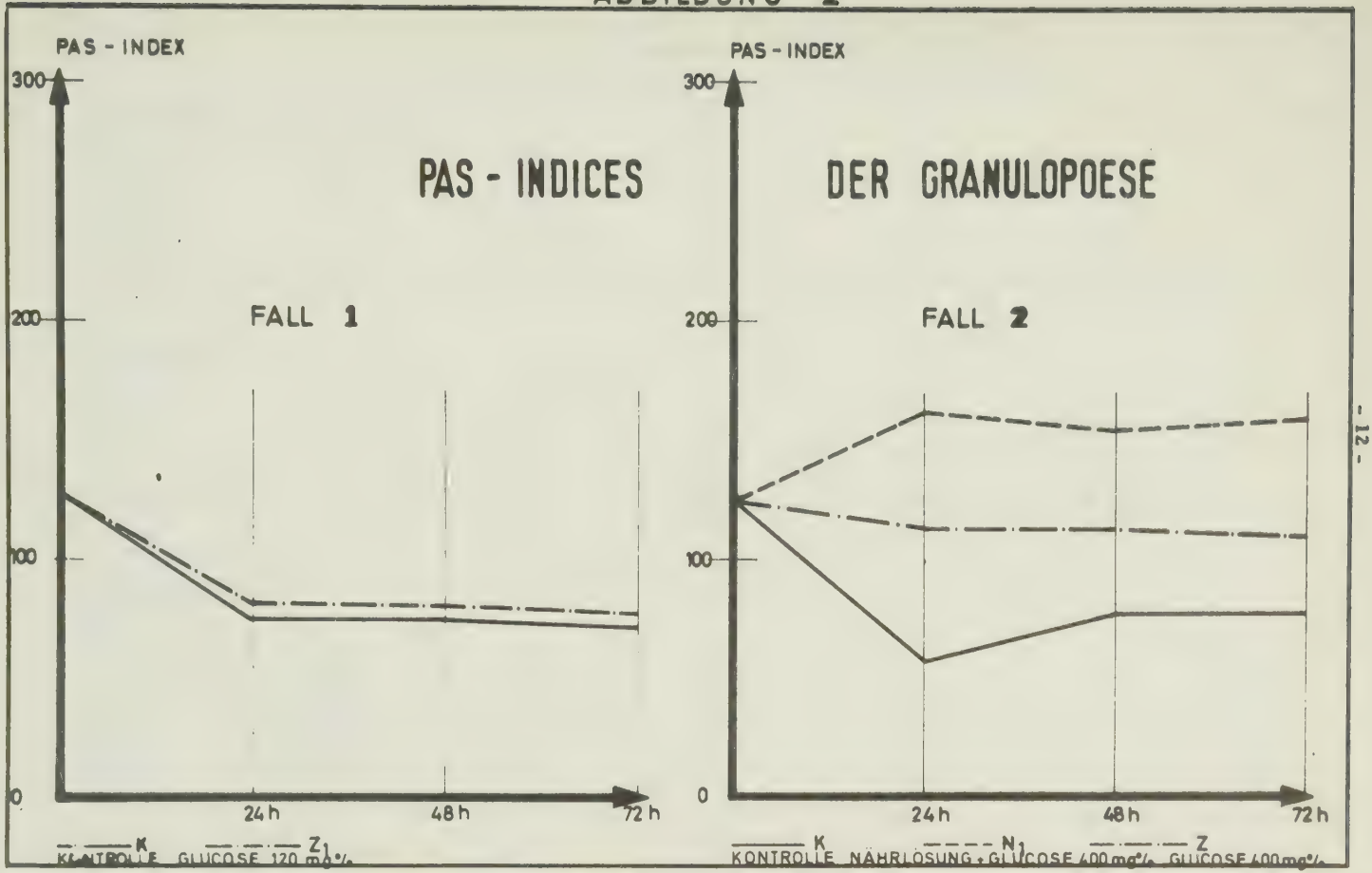

PAS - INDEX
300
200
100
0
PAS - INDICES
FALL 1
24h
48h
72h
K
Z1
KONTROLLE GLUCOSE 120 mg%
PAS - INDEX
300
200
100
0
DER GRANULOPOESE
FALL 2
24h
48h
72h
K
N1
Z
KONTROLLE NÄHRLÖSUNG + GLUCOSE 400 mg% GLUCOSE 400 mg%

Tabelle 1

	Mitoseindices - ERYTHROPOESE in ‰					
Kontrolle	0	24	48	72	96	120
Fall 1	12, 8	10, 2	0	0	-	-
Fall 2	20, 0	19, 2	7, 3	0	-	-
Fall 3	11, 6	7, 5	0	0	-	-
Fall 4	21, 9	11, 2	7, 7	-	0	0
Nährlösung						
Fall 2	-	25, 5	19, 4	10, 9	-	-
Fall 3	-	3, 6	5, 4	9, 7	-	-
Fall 4	-	20, 0	15, 6	-	0	0
Glucosezusatz						
Fall 1						
Gluc. -konz.	120 mg% -	14, 1	1, 83	0	-	-
	400 mg% -	10, 8	5, 32	6, 9	-	-
Fall 2	400 mg% -	22, 2	16, 4	0	-	-
Fall 3	800 mg% -	3, 1	0	0	-	-
Fall 4	800 mg% -	10, 4	0	-	0	0

Tabelle 2

	Mitoseindices - GRANULOPOESE in ‰					
	0	24	48	72	96	120
Kontrolle						
Fall 1	13, 9	11, 6	4, 2	0	-	-
Fall 2	21, 5	20, 6	9, 4	0	-	-
Fall 3	10, 9	10, 0	2, 1	0	-	-
Fall 4	24, 0	13, 9	10, 3	-	0	0
Nährlösung						
Fall 2	-	23, 2	21, 4	12, 5	-	-
Fall 3	-	11, 8	10, 0	7, 2	-	-
Fall 4	-	18, 7	17, 1	-	5, 8	5, 9
Glucosezusatz						
Fall 1						
Gluc.-konz. 120 mg%	-	12, 8	3, 1	1, 5	-	-
400 mg%	-	13, 5	11, 2	8, 1	-	-
Fall 2 400 mg%	-	21, 6	17, 4	6, 15	-	-
Fall 3 800 mg%	-	9, 7	0	0	-	-
Fall 4 800 mg%	-	14, 3	4, 1	-	0	0

PAS-Indices der GRANULOPOESE

1

	Zell-zahl	PAS-Index 0	100	200	300	mittl. PAS-Index
l.	633	51	267	184	131	128, 5
. Kontrolle	640	272	276	71	21	75, 3
. Gluc. -konz. 120 mg%	575	220	259	65	31	82, 2
l. Kontrolle	633	232	338	49	14	75, 5
l. Gluc. -konz. 120 mg%	589	231	255	98	5	80, 9
l. Kontrolle	670	295	274	89	12	72, 6
l. Gluc. -konz. 120 mg%	632	236	320	63	13	76, 9

:

.	1246	339	440	293	174	124, 0
l. Kontrolle	659	314	294	42	9	56, 6
l. Nährlsg. 1	565	93	93	317	62	162, 1
l. Gluc. -konz. 400 mg%	667	149	335	137	46	112, 0
l. Kontrolle	378	153	173	39	13	76, 9
l. Nährlsg. 1	659	94	238	216	111	154, 0
. Gluc. konz. 400 mg%	209	51	96	47	15	112, 0
. Kontrolle	376	169	138	51	18	78, 0
. Nährlsg. 1	657	108	195	209	145	159, 0
. Gluc. -konz. 400 mg%	211	72	66	52	21	110, 0

Fall 2: K., Anton 62 Jahre

Der Patient hat seit einer Kriegsverwundung einen Myocardschaden. Seit Mai 1971 ergab das Blutbild eine Leukocytose 11.000-16.000/mm^3. Er wurde überwiesen wegen Leukämieverdacht, der sich aber nicht bestätigte. Die Sternalpunktion am 2.2.1972 ergab: Erythropoese und Granulopoese waren normal verteilt. Das Blutbild hatte sich bis auf einen Rest Monocytose normalisiert.

Blutbild vom 2.2.1972

Ery:	4,79 Mill/mm^3	Leukoc:	5500/mm^3
HB:	14,8 g%	Bas:	1 %
HbE:	29,6 pg	Eos:	1 %
Retic:	22 ‰	Stab:	7 %
		Seg:	53 %
		Lymphoc:	31 %
		Monoc:	7 %

Es werden Kontrollkulturen (K) und Kulturen mit Nährlösung (N1) und mit 400 mg% Glucose (Z) angelegt. Es werden die rote und weiße Reihe mit der PAPPENHEIM- und PAS-Färbung ausgewertet (Abb. 2 und 3).

Unter dem Zusatz von 400 mg% Glucose reift die Erythropoese besser aus als die Kontrollen, aber unsere Nährlösung hat einen weit besseren Effekt.

Der rote Mitoseindex der 24 - Stunden- Kultur ist für alle Ansätze in etwa identisch, aber die 48-Stunden-Kultur zeigt für den Glucosezusatz und die Nährlösung gegenüber den Kontrollen einen erhöhten Mitoseindex. In der 72-Stunden-Kultur lassen sich nur noch für die Nährlösung Mitosen nachweisen.

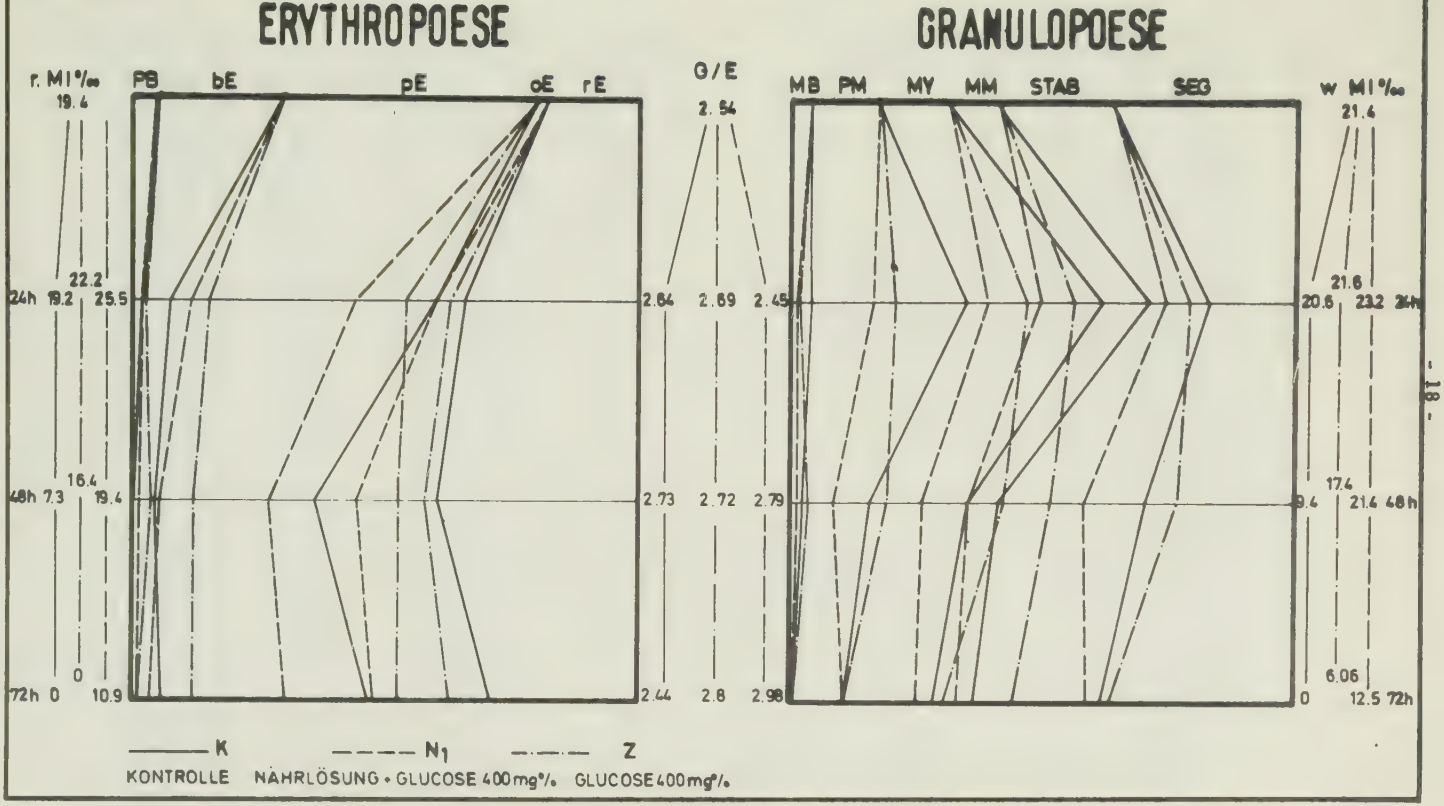
Die Reifungskurve der Granulopoese ergibt für die Kontrollen einen normalen Verlauf, während die Ausreifung unter Glucosezusatz besser, unter Nährlösung noch stärker beschleunigt wird. Die 24-Stunden-Kulturen weisen gleiche Mitoseindices auf, bei 48 und 72 Stunden sind sie unter Glucosezusatz deutlich höher, unter Vitaminzusatz noch höher.

Die G/E-Indices zeigen unwesentliche Abweichungen voneinander.

Die PAS-Färbung gibt Aufschluß über den Glucosegehalt der Zellen. Die weiße Reihe ergibt gute Unterschiede (Abb. 2). Der PAS-Gehalt der Kontrolle fällt bis 24 Stunden am stärksten ab, um dann etwa auf dem gleichen Stand zu bleiben. Die Zellen unter Glucosezusatz zeigen nach 24 Stunden nur einen leichten Abfall an PAS-Gehalt und der dann in etwa gleich hoch bleibt (Abb. 2, Seite 12). Mit der Nährlösung steigt der PAS-Gehalt der Zellen nach 24 Stunden sogar an, nicht nur gegenüber den Kontrollkulturen und Glucosezusatz-Kulturen sondern sogar gegenüber den Originalkulturen. Die starke Anfärbbarkeit bleibt bis 72 Stunden bestehen.

ABBILDUNG 3

FALL 2



Fall 3: H., Ida 74 Jahre

Die Aufnahme der Patientin erfolgte wegen allgemeiner Schwäche und einer Stauungspneumonie im rechten Unterlappen bei deutlicher zentraler und peripherer Lungenstauung. Wegen eines bekannten Plasmocytoms wurde am 9.2.1972 die Sternalpunktion ausgeführt. Dabei waren die Plasmazellen um 10% vermehrt, Granulopoese wenig vermindert. Die Erythropoese war vermehrt und linksverschoben, Megaloblastoide kamen vor.

Blutbild vom 5.2.1972

Ery:	2,7 Mill/mm^3	Leukoc:	5500/mm^3
HB:	8,3 g%	Bas:	1 %
HbE:	30,8 pg	Eos:	1 %
Retic:	26,0 ‰	MM:	1 %
		Stab:	2 %
		Seg:	77 %
		Lymphoc:	16 %
		Monoc:	2 %

Diagnose:
Plasmocytom ohne Progredienzzeichen mit megaloblastärer Reifungsstörung im Sinne einer Aufbrauchperniciosa, Herzinsuffizienz, Pneumonie.

Hier wurde der Glucosegehalt der Nährlösung auf 800 mg% erhöht und Kulturen als Kontrolle (K), mit Nährlösung (N2) und 800 mg% Glucose (Z) angelegt. Reifungskurven der roten und weißen Reihe sind in Abb. 4, die Mitoseindices in Tab. 1 und 2 dargestellt. Neben der PAPPENHEIM-Färbung wurde noch die PAS-Färbung ausgewertet.

Die Erythropoese reift bei 24 Stunden unter unserer Nährlösung besser, aber unter Glucosezusatz noch schneller aus. Diese Wirkung läßt nach 48 und 72 Stunden wieder nach.

Der Mitoseindex der Erythropoese der 24-Stunden- Kultur ist für alle Kulturen etwa gleich. Während die Nährlösung bei 48 und 72 Stunden noch einen Mitoseindex aufweist, zeigen die Zellen der Kontrollen und die unter Glucosezusatz keine Mitosen mehr.

In der Granulopoese ist die Reifungskurve nach 24 Stunden unter Glucosezusatz nach links, später wieder rechts verschoben, während die Nährlösung eine leichte Reifungshemmung hervorzurufen scheint.

Der Mitoseindex der Granulopoese verhält sich analog dem roten Mitoseindex.

Der G/E-Index ändert sich während der Inkubation kaum.

Die PAS-Indices (Abb. 5) zeigen eine ähnliche Verteilung wie Fall 2. Die Glucosekultur hat einen erhöhten PAS-Gehalt gegenüber den Kontrollen, während der PAS-Gehalt der Zellen unter Nährlösung weiter angestiegen ist.

Im Mikroskop ist zu beobachten, daß Zellen vakuolisiert sind.

ABBILDUNG 4

FALL 3

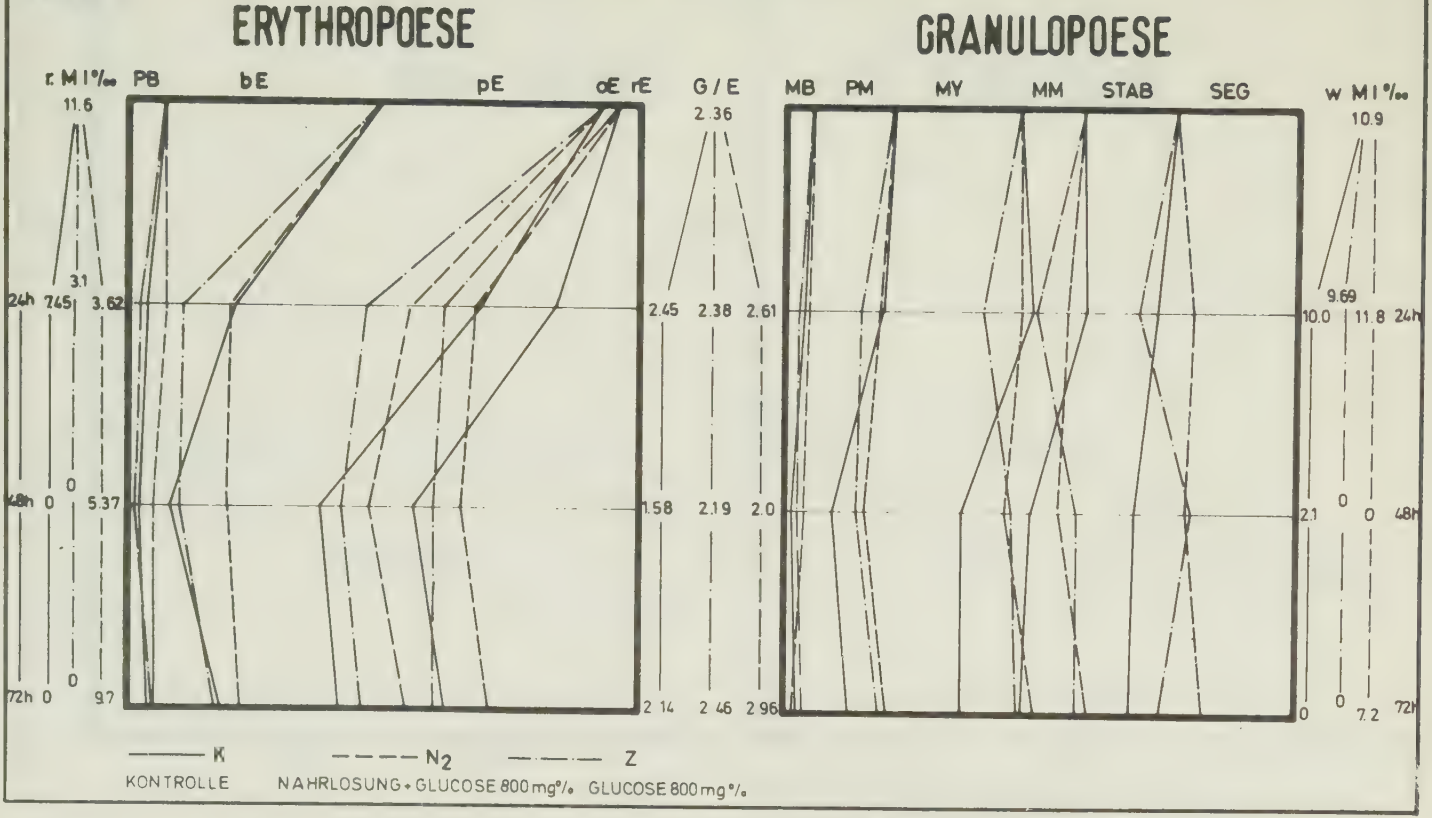
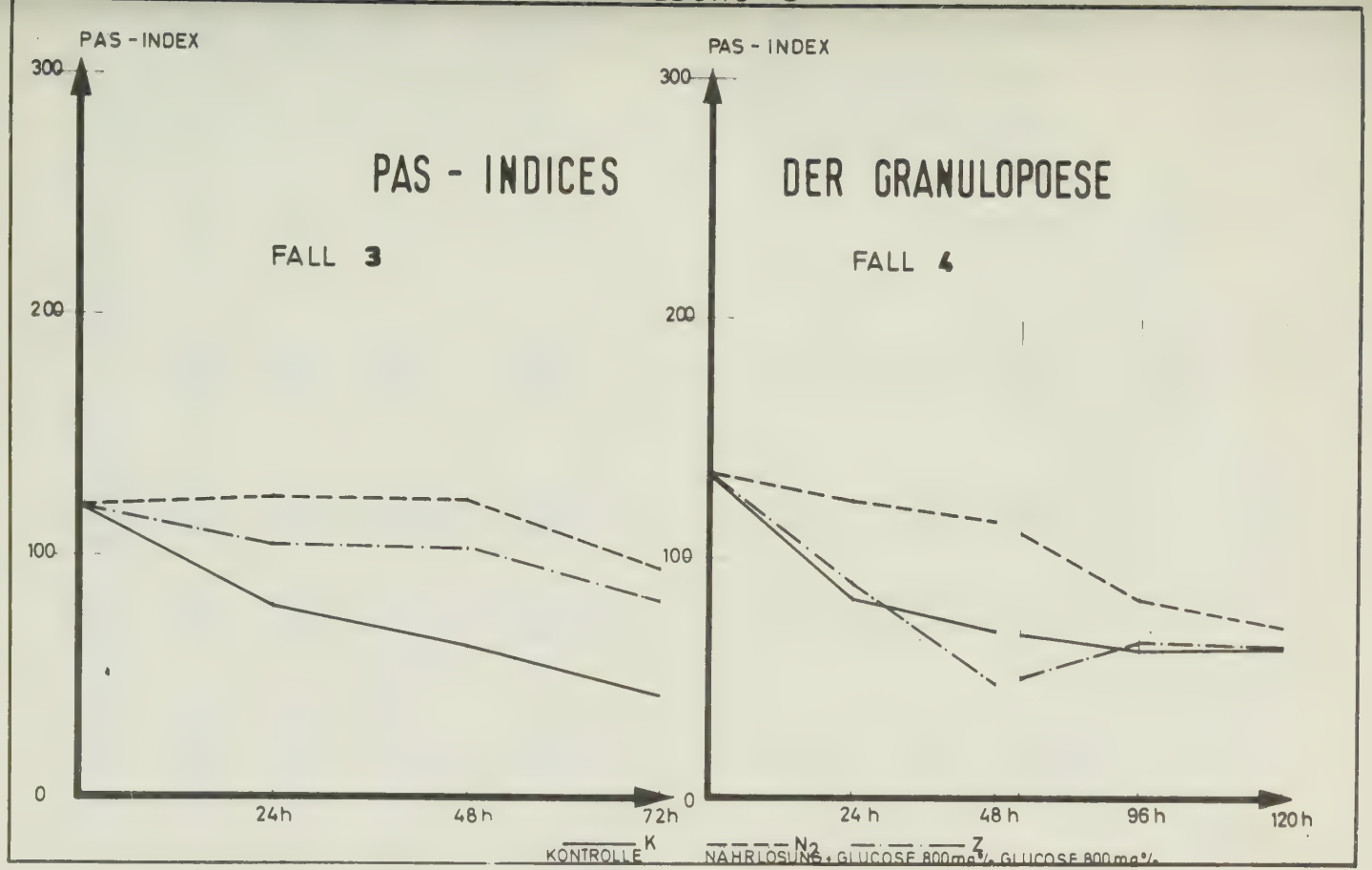


ABBILDUNG 5


PAS - INDEX
300
200
100
0
PAS - INDICES
FALL 3
24h
48h
72h
PAS - INDEX
300
200
100
0
DER GRANULOPOESE
FALL 4
24 h
48 h
96 h
120 h
K
KONTROLLE
N2
NÄHRLÖSUNG + GLUCOSE 800mg%
Z
GLUCOSE 800 mg%

abelle 4

PAS-Indices der GRANULOPOESE

all 3

	Zell-zahl	PAS-Index 0	100	200	300	mittl. PAS-Index
0 Std.	1140	345	373	259	163	121,0
4 Std. Kontrolle	597	273	205	89	30	78,9
4 Std. Nährlsg. 2	637	179	203	171	84	125,0
4 Std. Gluc.-konz. 800 mg%	619	175	277	124	43	105,7
8 Std. Kontrolle	578	283	268	27	0	62,7
8 Std. Nährlsg. 2	607	128	252	209	28	124,0
8 Std. Gluc.-konz. 800 mg%	519	145	224	133	17	104,5
2 Std. Kontrolle	551	325	214	12	0	43,2
2 Std. Nährlsg. 2	468	130	234	88	16	95,5
2 Std. Gluc.-konz. 800 mg%	519	207	219	71	22	82,3

all 4

) Std.	975	211	491	345	139	134,8
4 Std. Kontrolle	586	229	237	106	14	83,9
4 Std. Nährlsg. 2	552	67	231	148	54	124,5
4 Std. Gluc.-konz. 800 mg%	182	66	73	40	3	89,0
8 Std. Kontrolle	577	213	331	29	4	70,3
8 Std. Nährlsg. 2	431	77	224	118	12	115,1
8 Std. Gluc.-konz. 800 mg%	236	124	109	3	0	48,8
5 Std. Kontrolle	532	232	275	25	0	61,1
5 Std. Nährlsg. 2	646	156	445	39	6	83,7
5 Std. Gluc.-konz. 800 mg%	286	104	177	5	0	65,4
) Std. Kontrolle	615	227	386	2	0	63,5
) Std. Nährlsg. 2	417	127	280	10	0	72,0
) Std. Gluc.-konz. 800 mg%	382	153	229	0	0	60,0

Fall 4: St., Angelika 67 Jahre

Die Aufnahme erfolgte unter Verdacht auf ossäre Metastasen eines im Frühjahr 1961 operierten und 1971 nachbestrahlten Lymphosarkoms der rechten Leiste. Am 17. 2. 1972 ergab die Sternalpunktion einen normalen Knochenmarkbefund.

Blutbild vom 14. 2. 1972:

Ery:	4,6 Mill/mm^3	Leukoc:	5000/mm^3
HB:	15,5 g%	Bas:	2 %
HbE:	33,6 pg	Eos:	1 %
Retic:	5,0 ‰	Stab:	2 %
		Seg:	65 %
		Lymphoc:	22 %
		Monoc:	8 %

Hier werden die gleichen Kulturen angelegt wie in Fall 3, aber nicht nur 72 Stunden, sondern 120 Stunden kultiviert.

Die Reifungskurve (Abb. 6) der Erythropoese zeigt nach 24 Stunden für die Nährlösung eine Reifungsverzögerung, später bis 120 Stunden eine stärkere Reifungsbeschleunigung. Der Glucosezusatz bewirkt eine Reifungsverzögerung nach 48 Stunden. Die Erythroblasten reifen später aber auch stärker aus als die Kontrollkulturen, aber nicht so stark wie die Zellen unter Nährlösung.

Die roten Mitoseindices der Glucosekulturen liegen bis 48 Stunden höher als die Kontrollen, aber die Kulturen unter der Nährlösung zeigen weit höhere Mitoseindices. Nach 96 und 120 Stunden werden in keinem Präparat Mitosen gesehen.

Die Granulopoese zeigt nur unwesentliche Veränderungen für die Nährlösung und den Glucosezusatz gegenüber den Kontrollen.

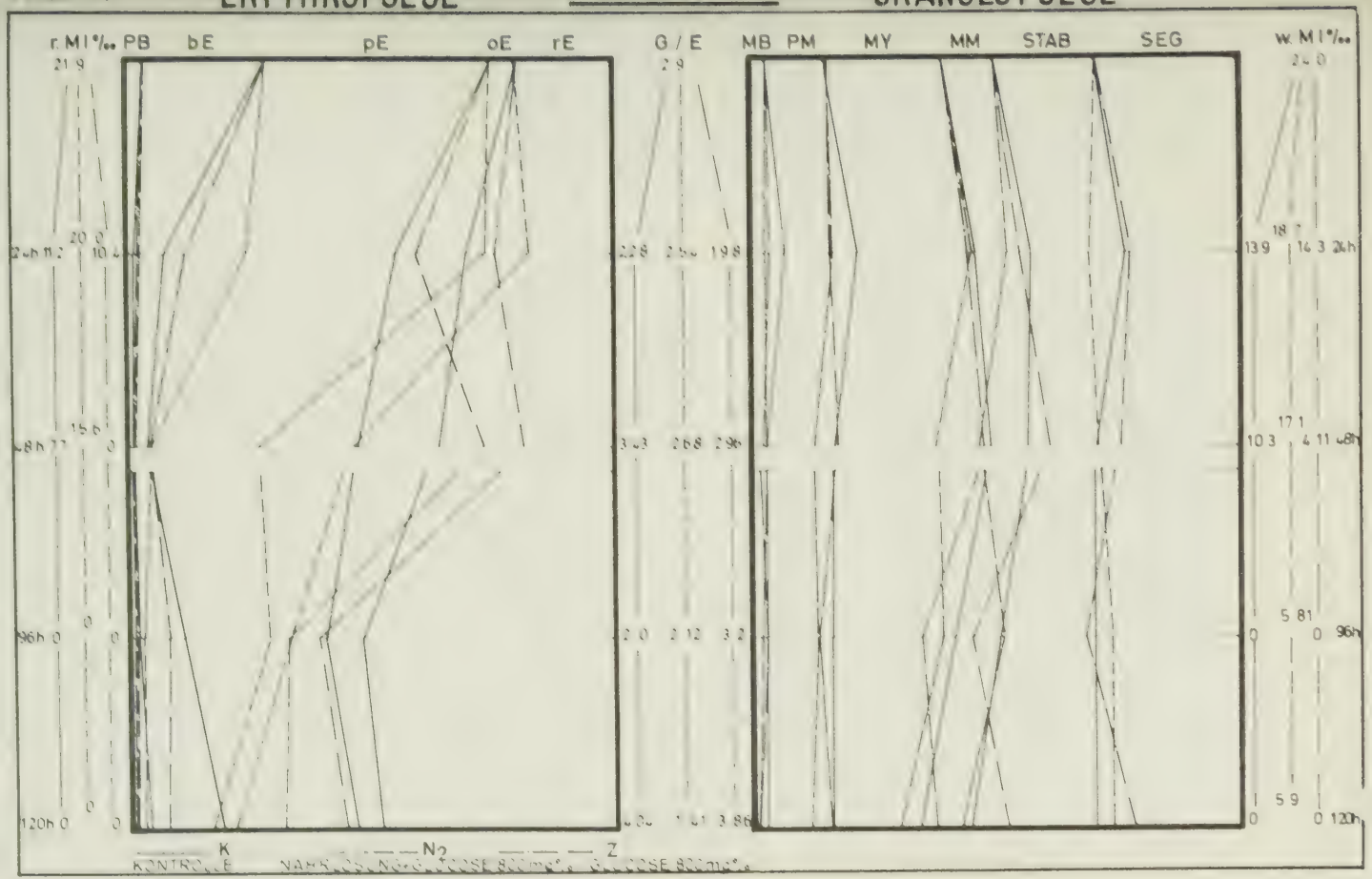
Die Mitoseindices der Granulopoese sind in etwa bis 48 Stunden gleich, aber die der Nährlösung liegen immer weit über den Kontrollen.

Der G/E-Index zeigt keine großen Veränderungen.

Die graphische Darstellung der PAS-Indices in Abb. 5 zeigt, daß unter der Nährlösung der PAS-Gehalt der Zellen bis 48 Stunden relativ hoch bleibt, fällt dann bis 120 Stunden fast bis auf Werte der Kontrollkultur ab, während der PAS-Gehalt der Glucosekulturen in etwa den Kontrollen entspricht.

Auch in diesen Kulturen zeigt sich eine zunehmende Vakuolisierung.

FALL 4 ERYTHROPOESE ABBILDUNG 6 GRANULOPOESE



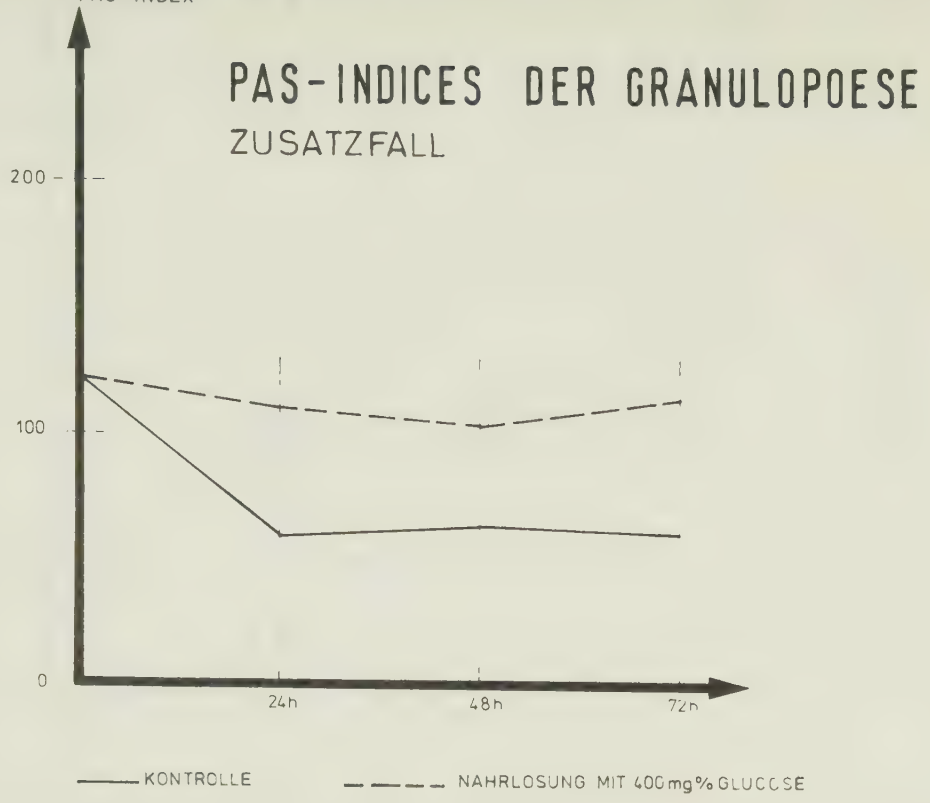
Da die Ergebnisse (Fall 2) mit 400 mg% Glucosezusatz bezüglich des PAS-Gehaltes am besten waren, sollten sie an einem weiteren Fall bestätigt werden. Wir haben deswegen eine weitere Kultur mit Nährlösung, die einen Glucosezusatz von 400 mg% enthält, angesetzt, wobei aber HANK's-Lösung durch Eigenserum ersetzt wurde. Die Kulturen werden nur auf ihren PAS-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 und Tab. 5 wiedergegeben. Im Mikroskop zeigen sich Zellen wiederum vakuolisiert wie in Fall 3 und 4. Die graphische Darstellung des PAS-Gehaltes ergibt ebenfalls Ähnlichkeit mit Abb. 5. Der PAS-Gehalt der granulopoetischen Zellen liegt weit über denen der Kontrolle, aber nicht so extrem hoch wie in Fall 2.

Die caryologischen Kurven (Abb. 8) fassen die Mitosephasen aller differenzierten Versuche zusammen. Die Kurven ohne und mit Glucose, bzw. Nährlösung weichen nicht wesentlich voneinander ab.

Insgesamt wurden in der Erythropoese
ohne Glucose 51
mit Glucose und Nährlösung 57

in der Granulopoese
ohne Glucose 108
mit Glucose und Nährlösung .....122 Mitosen gezählt.

ABBILDUNG 7


PAS-INDEX
PAS-INDICES DER GRANULOPOESE
ZUSATZFALL
200
100
0
24h
48h
72h
KONTROLLE
NAHRLOSUNG MIT 400 mg% GLUCOSE

belle 5

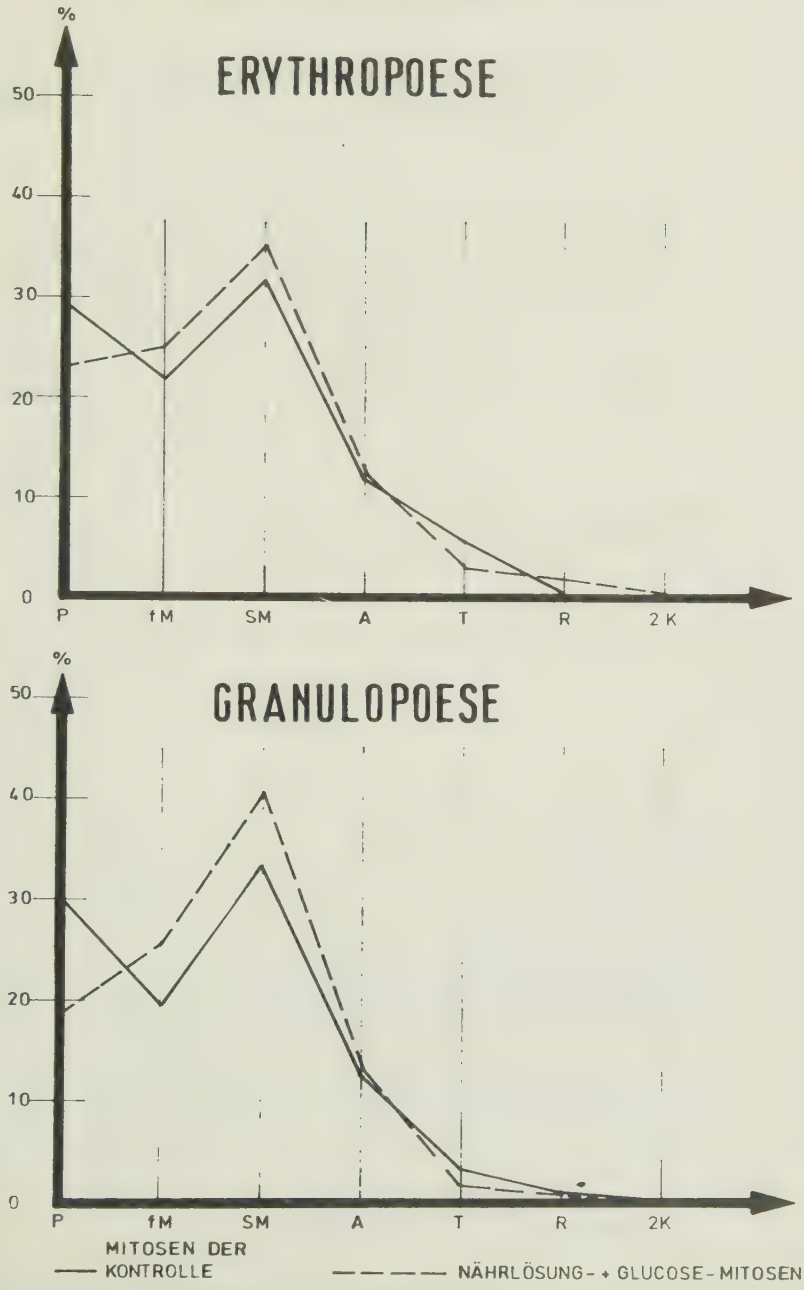
Fall 5

ißo Reihe: Gesamtindex aller Zellen

	Zahl	PAS 0	100	200	300	mittl. Inde
ntrolle	1120	287	420	296	117	121, 3
Stunden ntrolle	649	339	246	59	5	58, 3
Stunden arlösung	682	181	288	175	38	110, 0
Stunden ntrolle	659	314	283	56	6	62, 7
Stunden arlösung	620	207	210	181	22	103, 0
Stunden ntrolle	725	350	318	57		59, 5
Stunden arlösung	716	197	272	2[illegible]	38	114, 0

ABBILDUNG **8**

CARYOLOGISCHE KURVEN



Um die gewonnenen Ergebnisse besser auswerten zu können, berechnen wir Fall 2 und die Zusatzkultur auf Signifikanz. Wir benutzen dabei das sehr empfindliche χ^2 - Verfahren.

$$\chi^2 = \frac{(B - E)^2}{E}$$

Dabei ist B der Beobachtungswert und E der Erwartungswert. χ^2 ist logarithmisch mit der Signifikanz P verknüpft. Ist der Wert $P < 0,05$, so ist der Unterschied zufallsbedingt; ist $P < 0,01$, besteht ein statistisch signifikanter Unterschied. Als klassische Sicherheitsgrenze gilt $P = 0,0027$.

Fall 2 ergibt bei der Signifikanzberechnung für die Reifungskurven folgende Werte:

Erythropoese

	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
Kontrolle/Glucosezusatz	$P < 10^{-5}$	$P < 10^{-10}$	$P < 10^{-5}$
Kontrolle/Nährlsg. mit 400 mg% Glucose	$P < 10^{-8}$	$P < 10^{-6}$	$P < 10^{-8}$

Granulopoese

Kontrolle/Glucosezusatz	$P < 10^{-10}$	$P < 10^{-4}$	$P < 10^{-4}$
Kontrolle/Nährlsg. mit 400 mg% Glucose	$P < 10^{-10}$	$P < 10^{-10}$	$P < 10^{-10}$

Die Signifikanzberechnung des PAS-Index ergibt, daß alle Werte für $P < 10^{-10}$ sind, also weit unter der klassischen Sicherheitsgrenze liegen. Die Signifikanzberechnung für den Zusatzfall ergibt das gleiche Ergebnis.

Die P-Werte wurden den χ^2 - Tabellen von BELITZ (3) entnommen.

Beurteilung der Ergebnisse und Diskussion:

Die Proliferation, die sich nach BOLL im Knochenmark aus Reifung und Regeneration zusammensetzt, wird mit Hilfe von Auszählungen aus der PAPPENHEIM-Färbung bewertet, während eine Änderung im Glucosegehalt der Zelle durch die halbquantitative Auswertung der PAS-Färbung nachgewiesen werden kann.

Um eine Proliferationsanregung durch Glucose bzw. durch die nach mehreren Einzeluntersuchungen (14, 17, 18, 19) zusammengestellte Nährlösung beurteilen zu können, müssen wir die Komponente Reifungs- und Mitoseaktivität der Erythropoese und Granulopoese gesondert betrachten.

Die Reifungskurven der Erythropoese von den Kulturen mit Glucosezusatz zeigen unabhängig von ihrer Glucosekonzentration in allen Fällen eine verstärkte Ausreifung. Bei niedriger Glucosekonzentration ist die Ausreifungsbeschleunigung schon deutlicher sichtbar. Den größten Effekt auf die Ausreifung erzielt die Glucosekonzentration von 400 mg%. Dies zeigt die Signifikanzberechnung, denn die Werte von P bewegen sich zwischen 10^{-5} und 10^{-8}. Bei 800 mg% ist die Stimulation zwar auch vorhanden, aber es zeigt sich keine weitere Steigerung durch die höhere Konzentration, dafür tritt eine Zellvacuolisierung, vermutlich osmotisch bedingt, auf. Der Nährlösungszusatz beschleunigt die Ausreifung noch mehr als Glucose alleine. Dabei zeigen sich die besten Ergebnisse bei der Nährlösung, die eine Glucosekonzentration von 400 mg% enthält. Hier liegen die P-Werte ebenfalls weit unter der klassischen Signifikanzgrenze, nämlich zwischen 10^{-6} und 10^{-8}.

Die Mitoseindices liegen für die Nährlösung deutlich über denen der Kontrollen und den Kulturen mit Glucosezusatz. Dies Ergebnis ist nicht signifikant, da bei jeder geprüften Konzentration zuwenig Mitosen vorliegen. Wir können also folgern, daß die Nährlösung die Ausreifung signifikant fördert, während die Regenerationsförderung zu diskutieren bleibt. Die beste Wirkung auf die Proliferation wird erreicht, wenn die Nährlösung einen Glucosezusatz von 400 mg% enthält.

Bei der Granulopoese zeigt wiederum die Nährlösung mit 400 mg% Glucosezusatz die beste Wirkung im Sinne einer Ausreifungsbeschleunigung. Die P-Werte liegen über 10^{-10}. Glucosezusatz allein hat nur einen geringfügigen Einfluß auf die Reifung.

Die Mitoseindices der Granulopoese zeigen die gleichen Tendenzen zur Erhöhung wie in der Erythropoese. Allein durch den Vitaminzusatz zur Glucose werden die Mitoseindices nennenswert erhöht (Tab. 2). Die Signifikanzberechnung kann dies nicht bestätigen, da wieder zu wenig Mitosen in die einzelnen Berechnungen mit einbezogen werden können.

Wir können also feststellen, daß Glucosezusatz allein schon eine fördernde Wirkung auf die Reifung der Erythropoese und Granulopoese bei normalem Knochenmark hat, die Nährlösung verbessert diese Wirkung sichtbar. Die Regeneration wird auch gesteigert, jedoch wegen zu kleiner Zahlen je Versuchsgruppe nicht signifikant.

Die PAS-Färbung ergibt in allen Fällen ein eindeutiges Ergebnis. Unsere Glucosezusätze erhöhen den PAS-Gehalt der weißen Reihe gegenüber den Kontrollkulturen, sichtbar im Anstieg des PAS-Index wie schon von BOLL (4) und BRUNS (5) beschrieben. ASTALDI (1) kommt zu ähnlichen Ergebnissen. Weiterhin zeigen die graphischen Darstellungen eine Verbesserung der Glucosewirkung durch Zusatz der Vitaminkombination: Der PAS-Gehalt der Zellen kultiviert in Nährlösung liegt deutlich über dem Gehalt bei Glucosezusatz. Die Signifikanzwerte liegen alle unter 10^{-10}. Wiederum wird die beste Wirkung bei einer Glucosekonzentration von 400 mg% in der Nährlösung erreicht. Dabei zeigt sich sogar eine Erhöhung des PAS-Gehaltes der Zellen über die Originalausstriche hinaus.

Unsere Versuche zeigen uns eine Möglichkeit der besseren Kultivierung von Knochenmarkzellen in vitro. Das Überleben der Zellen in der Koagulum-Kultur ist unter anderem auch abhängig von der Osmolarität der Lösung, in der sich die Zellen befinden. Wir konnten zeigen, daß die beste Osmolarität für Knochenmarkkulturen bei einem Zusatz von 400 mg% Glucose zur HANK'schen-Lösung besteht. Wir stellen darüber hinaus fest, daß eine Vitaminkombination zusätzlich zum Glucosezusatz von 400 mg% die Lebensbedingungen der Knochenmarkzellen in der Kultur noch erheblich verbessert.

Dies zeigt sich im einzelnen darin, daß der Hauptenergielieferant Glucose zwar die Anfärbbarkeit mit Schiff'schem-Reagenz der granulopoetischen Zellen signifikant steigert und die Reifung besonders der Erythroblasten fördert, aber durch Zusatz der Nährlösung wird sowohl die Reifung als auch der Glucosegehalt der Zellen signifikant und der Mitoseindex deutlich gesteigert. Diese besseren Lebensbedingungen kann man zwar einerseits darauf zurückführen, daß die Osmolarität bei einem Glucosezusatz von 400 mg% optimal ist, aber andererseits ist auch das Angebot des Hauptenergielieferanten Glucose stark erhöht und möglicherweise wird durch die Anwesenheit der Vitaminkombination der Stoffwechsel der Zellen weiter verbessert. Diese These wird erhärtet durch die vermehrte Regeneration der Kulturen bei Anwesenheit der Nährlösung. Ein weiteres Glucoseangebot von 800 mg% würde noch weiter förderlich sein, aber die Hyperosmolarität schädigt die Kulturen dann so, daß keine weitere Verbesserung möglich ist. Dies ist sichtbar an der Vacuolisierung der Zellen wie in Fall 3 - 5.

Damit ist anzunehmen, daß die Osmolarität ein wesentlicher Faktor für die Lebensbedingungen von Knochenmarkkulturen darstellt. Da im Fall 5 die gleiche Nährlösung vorliegt wie in Fall 2, die Lösung aber durch Zusatz von Serum hyperosmolar ist, liegen die Werte niedriger als bei einer osmolaren Lösung wie in Fall 2.

Diese Arbeit zeigt also die Möglichkeit auf, daß die Kultivierung der Knochenmarkzellen in vitro durch den Zusatz der Nährlösung mit einem Glucosegehalt von 400 mg% zu verbessern ist. Insbesondere scheint nach Fall 4 die Auswertbarkeit der Knochenmarkkultur von 3 - 4 auf 5 Tage durch den Glucosezusatz verbessert werden zu können. Weiteres Angebot von Energielieferanten ist wegen der osmotischen Verhältnisse nicht möglich, sodaß zur noch längeren Kultivierung doch zu Mediumwechsel übergegangen werden muß. Das bekannte Proliferationsmuster (Boll 4) ist jedoch unverändert, eine Bestätigung der Annahme, daß dies gesetzmäßig, entsprechend den Verhältnissen in vivo, abläuft.

Zusammenfassung:

Es wurde durch Sternalpunktat gewonnenes Knochenmark als Kultur angelegt, teils mit teils ohne Zusatz von Glucose in verschiedener Konzentration und teils unter Zusatz einer Vitaminkombination von Ascorbinsäure, Folsäure, TPP, ATP inkubiert. Die nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden ausgestrichenen Präparate wurden mit der PAS-Reaktion und nach PAPPENHEIM gefärbt. Die einzelnen Reifungsstadien der verschiedenen Zellreihen und besonders die Mitosen und deren Phasen wurden differenziert. Außerdem wurde mit Hilfe der PAS-Färbung die Glucoseeinlagerung in der Zelle halbquantitativ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Kurven und Tabellen zusammengefaßt.

Es konnte eine signifikante Förderung der Reifung von Erythropoese und Granulopoese und eine signifikante Erhöhung des Glucosegehaltes der Zellen der weißen Reihe durch Glucoselösung aber noch mehr durch zusätzliche Nährlösung bei normalem Knochenmark festgestellt werden. Die Regeneration war zwar nach den Mitoseindices deutlich, jedoch nicht signifikant vermehrt. Bei einer Endkonzentration von 200 mg% Glucose in der Kultur zeigt sich wenig Wirkung, während bei einer Endkonzentration von 400 mg% Glucose in der Koagulumskultur die beste Wirkung erzielt wird. Wir beziehen diese Wirkungen auf bessere Lebensbedingungen der Kulturen durch Zusatz der Hauptenergieträger und Vitamine. Ein höheres Glucoseangebot führte zu schlechteren Ergebnissen, offenbar wegen der Hyperosmolarität.

Legende zu den Tabellen und Abbildungen:

MI ‰ .. Mitoseindex ‰ = Zahl der Mitosen, berechnet auf 1000 teilungsfähige Zellen

r MI ... Mitoseindex der Erythropoese

w MI ... Mitoseindex der Granulopoese

G/E .... Verhältnis der Gesamtzahlen der Granulopoese und Erythropoese

Abkürzungen der Zellen und Mitosephasen siehe S. 6

Auf der Abszisse der Reifungskurven sind die erythropoetischen bzw. granulopoetischen Vorstufen in Prozenten additiv aufgetragen, auf der Ordinate die Kulturzeit in Stunden.

Literaturverzeichnis:

1. ASTALDI, G. MEARDI, G. et KARANOVIC, J. — Recherches expérimentales sur le contenu en glycogène des granuloblastes de la leucémie myéloide chronique survivants in vitro et irradiés au moyen de Rayons X. Revue Belge de Pathologie et de Médecine Expérimentale Tome XXVII, Nr. 1, Février 1959

2. AVERDUNK, R. — Steigerung des Wachstums einer in Laktalbumin-Hefe-Medium wachsenden Gewebekulturzelllinie durch Zufuhr der verbrauchten Nährstoffe. Zbl. Bakt., I. Abt. Org. 217, 14 (71)

3. BELITZ, H. — Sonderdruck aus: Der Mathematikunterricht. Ernst Klett Verlag, Stuttgart Heft 3 (1960)

4. BOLL, I. — Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Springer Verlag, Heidelberg 1966

5. BOLL, I., HEYER, B., DÜRING, G., SCHARIOT, G., SCHWEIHOFER, E. und BRUNS, H. — Quantitative Ermittlung des Fermentgehaltes und der PAS-positiven Substanzen von Knochenmarkzellen in vivo und in vitro. Klin. Wschr. 48, 1233 (1970)

6. BRUNS, H. — Die PAS-Reaktion in der Knochenmarkkultur. Med. Diss. FU Berlin, 1969

7. BUDDECKE, E. — Grundriß der Biochemie. Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin 1970

8. GEIGY - Tabelle — Auflage 1960

9. GÜNTHER, T. — Persönliche Mitteilungen

10. HECKNER, F. — Zyto- und Histochemie in der Hämatologie. Berlin - Göttingen - Heidelberg, Springer 1963

11. HERTL, M. — Zytochemische Untersuchungen an Knochenmarkzellen. Folia haemat. N. F. 3, 269, 1959

12. HERTL, M. THOMAS, K. — Zytochemische Untersuchungen an Knochenmarkzellen in der Kultur. Folia haemat. N. F. 3, 4, 1959

13. KAHN, P. — Zytochemische Untersuchungen bei akuten Leukosen. Klin. Wochenschr. 43, 1038, 1965

14. KAISER, K. — Die Wirkung von ATP auf die Proliferation von Knochenmarkkulturen. Med. Diss. FU Berlin 1970

15. KARLSON, P. — Lehrbuch der Biochemie. Thieme-Verlag (1970)

16. RAUEN, H. M. — Biochemisches Taschenbuch. Springer - Verlag, Heidelberg 1964

17. STEINBRÜCK, B. — Die Wirkung von TPP auf die Proliferation von pathologischem Knochenmark. Med. Diss. FU Berlin 1970

18. SCHMIDT, N. L. — Die Wirkung der Ascorbinsäure auf die Proliferation von Knochenmark in Kulturen. Med. Diss. FU Berlin 1970

19. WILLIGERODT, P. — Die Wirkung der Folsäure auf die Proliferation von nicht megaloblastischem Knochenmark in vitro. Med. Diss. FU Berlin 1970

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Boll für die Überlassung des Themas und für die immerwährende Unterstützung zur Bearbeitung des Aufgabengebietes.

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie EURATOM-GSF, Nr. 031-64-1 BIAD.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Lebenslauf

Ich wurde als Sohn der Eheleute Hans und Magdalene Herting am 17.11.1946 in Lippstadt/Westf. geboren.
Von 1953 bis 1958 besuchte ich die Volksschule zu Rüthen, Kreis Lippstadt, wohin meine Eltern und ich 1948 gezogen waren. Nachdem wir 1958 wieder nach Lippstadt zurückgezogen sind, besuchte ich das dortige Ostendorf-Gymnasium bis zur mittleren Reife im Jahre 1965.

Dann ging ich von 1965 an zur Upland-Schule in Willingen, Kreis Waldeck, wo ich auch im Juni 1967 mein Abitur ablegte.

Seit dem Wintersemester 1967 studiere ich Zahnmedizin an der FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN, legte im Sommer 1970 die zahnärztliche Vorprüfung ab und bestand im Sommer 1973 das Staatsexamen.